Fibrinolyse und arterielle Obliteration

Untersuchungen der Spontanfibrinolyse bei Patienten und Entwicklung einer neuen Fibrinolysebestimmungsmethode

RAINER MÜLLER

1962

Aus der Medizinischen Poliklinik der Universität München

Direktor: Professor Dr. W. Seitz

FIBRINOLYSE UND ARTERIELLE OBLITERATION

Untersuchungen der Spontanfibrinolyse bei Patienten und Entwicklung einer neuen Fibrinolysebestimmungsmethode.

Inaugural - Dissertation
zur
Erlangung der Doktorwürde
in der
gesamten Medizin
verfasst
und einer
Hohen Medizinischen Fakultät
der
Ludwig - Maximilians - Universität
zu München

vorgelegt von

Rainer Müller
aus
Marktredwitz

München 1962

Mit Genehmigung der Medizinischen Fakultät
der Universität München

Referent: Professor Dr. W. Seitz
Dekan: Professor Dr. A. Herrmann

Tag der mündlichen Prüfung: 8.1o.1962

RIJKSUNIV. BIBLIOTHEEK LEIDEN

Fotodruck: Mikrokopie G.m.b.H. München 2, Weinstr. 4

Für die großzügige Unterstützung mit Rat und Tat bin ich Herrn Dr. A. W a l c h e r zu großem Dank verpflichtet. Ebenso danke ich Herrn Priv. Doz.Dr.N.Goossens für wertvolle Ratschläge und dem Labor 225a für die nette Arbeitsatmosphäre.

Meiner Mutter gewidmet, die mir
mein Studium ermöglicht hat.-

Wenn es im Organismus im Rahmen des primären Wundverschlusses zur Blutgerinnung kommt, so folgt normalerweise eine Wiederauflösung dieses "Provisoriums", sobald es durch bindegewebige Struktur ersetzt ist. Dieser Vorgang wird Fibrinolyse genannt und kann unter bestimmten Bedingungen auch im Reagenzglas erfolgen. Die ersten derartigen Beobachtungen wurden im Jahre 1838 von Denis und 1846 von Zimmermann (aus 61) gemacht, die von einer Wiederauflösung von in Salzlösung aufbewahrtem Menschenblut berichten. Später stellte Dastre (52) bei seinen Hundeversuchen ähnliche Beobachtungen fest (1893 - 95) und fand, daß sich das einmal gelöste Fibrin durch erneute Thrombinzugaben nicht mehr ausfällen ließ. Von ihm stammt auch der Ausdruck Fibrinolyse. Ein eigenes Fibrinolyseferment wird erst 1905 von Nolf gefordert, der sich durch Peptonschocks an Tieren fibrinolytisch aktives Plasma herstellte. 1906 begann Morawitz seine Studien an Leichenblut. Er teilt mit, daß sich das Blut plötzlich Verstorbener nach erfolgter Gerinnung wieder auflöse und auch Fibrin normalen Blutes zerstören könne. Damit wurden die bereits von Morgangni und J. Hunter im Jahre 1761 bzw. 1786 gemachten Beobachtungen geklärt, die in Leichen plötzlich Verstorbener "ungeronnenes" Blut fanden (52). Mit der praktischen Auswertung dieses Phänomens erregte der Russe Yudin 1937 (45) einiges Aufsehen, als er von Blutübertragungen solchen "dekoagulierten" Blutes ohne Antikoagulantienzusätze berichtete.
In diesen Fällen scheint wie in den nun zahlreich einsetzenden Untersuchungen das Syndrom "Schock" die wesentliche Rolle für die Entstehung des aktiven Fermentes zu spielen. So untersuchte Macfarlane 1937 (60) Patientenblut vor und nach Operationen und konnte postoperativ einen höheren Lyseprozentsatz feststellen, Beobachtungen, die später von Imperati und von v. Kaulla 1947 (61) bestätigt werden konnten. Auf die Auswirkungen des Schocksyndroms lassen sich wahrscheinlich auch die Ergebnisse von Tagnon, Levenson, Davidson und Taylor zurückführen, die 1946 Fibrinolyse bei schweren Verbrennungen, tödlicher Narkosevergiftung und nach schweren Blutverlusten beobachtet haben.

In ihrer zusammenfassenden Übersichtsarbeit berichten Macfarlane und Biggs 1948 (61) ebenfalls von gesteigerter Fibrinolyse nach Traumen, Schockzuständen, schwerer körperlicher Arbeit und nach Adrenalininjektionen. Ausführliche Untersuchungen über die beiden letzteren Phänomene stammen von Fearnley und Lackner (37), die mit ihrer "Abkühlungsmethode" der verwendeten Blutproben schon bei Normalpersonen, also ohne vorausgegangenen "stress", eine Fibrinolyse erhalten, die in ihrem zeitlichen Ablauf bereits durch einen Spaziergang von ein bis zwei Kilometern oder noch stärker durch Adrenalininjektionen von 0,25 - 1 mg beschleunigt werden kann. Übereinstimmend zu obigen Erkenntnissen stehen auch Billimora und Drysdale (20) in ihren Ergebnissen.
Viel umstritten sind die hämorrhagischen Diathesen im Gefolge von geburtshilflichen Komplikationen. Während Favre-Gilly (39) und Philips (74) an eine Afibrinogenämie durch Fibrinogenolyse glauben, im Gegensatz zu Ratnoff (75), erklären die Mehrzahl der Forscher (39, 86, 77) die Blutungen bei diesen Krankheitsbildern (wie z.B. Retention mazerierter Föten, Abruptio Placentae, Amnion Fluidembolism, Eklampsie, Retentio Placentae, kriminellen Aborten usw.) durch die Einschwemmung von thromboplastinreichem Material, das zu einem mikroembolischen Niederschlag des Fibrins an den Kapillarwänden führen soll und somit das Fibrin aufbraucht (sog. Verbrauchskoagulopathien). Beller (75) konnte in der Placenta jedoch kein aktives Thromboplastin finden. Während der Schwangerschaft konnten Gillman, Naidoo und Harthorn (41) einen Fibrinogenanstieg von durchschnittlich 350 mg auf 550 mg und einen Fibrinolysinaktivitätsverlust mit plötzlichem Anstieg kurz nach der Geburt beobachten. Smith, Wilson und Munnel (61) berichten 1946 von einer fibrinolytischen Aktivität während der Menstruation.

In den letzten Jahren wurden nahezu alle Krankheitsbilder in ihrer Beziehung zur Fibrinolyse untersucht. Die dabei oft unterschiedlichen Ergebnisse sind meist auf die unterschiedlichen Methoden zurückzuführen. Fast einheitlich wird jedoch eine Steigerung der Fibrinolyse bei malignen

Tumoren, bei chronischen Leberprozessen, bei metastasierendem Prostatacarcinom und bei Lungenoperationen anerkannt (2o, 26,3o,39,74,75,79,86). Ferner soll die Fibrinolyse bei malignen Blutkrankheiten, bei Pneumonie (26), Blutgruppeninkompatibilität (Schockfolge), Alkoholvergiftung, Urämie, Herzfehlern, hochfieberhaften Erkrankungen usw. gesteigert sein.
Die Untersuchungen von Fearnley, Vincent und Chakrabarti (38) über die fibrinolytische Aktivität bei Zuckerkranken ergaben einen Aktivitätsverlauf parallel dem Blutzuckerspiegel, wobei der plötzliche Aktivitätsanstieg bei Erreichen des Blutzuckerminimums auf die Ausschüttung des Adrenalins als einem der physiologischen Antagonisten zum Insulin zurückgeführt wurde. Weiterhin scheinen die weiblichen Sexualhormone einen Einfluß auf die Fibrinolyse ausüben zu können. So berichten Gillman, Naidóo und Harthorn (41) von Rattenversuchen mit gesteigerter Fibrinolyse unter der Therapie dieser Hormone. Vielleicht ließe sich damit die verminderte Neigung zur Coronarthrombose bis zur Menopause beim weiblichen Geschlecht zum Teil erklären.

A k t i v i e r u n g s m e c h a n i s m e n :

Das Vorliegen des aktiven Fermentes im Plasma hängt neben der noch ungeklärten Spontanaktivierung (vermutlich ist es ein autokatalytischer Prozeß wegen des S-förmigen Kurvenverlaufs in der graphischen Darstellung (3)) von der Ausschwemmung verschiedener Gewebeaktivatoren in die Blutbahn ab, wie Astrup und Permin 1947 zeigen konnten.
Andererseits unterscheidet sich der Gewebeaktivator von dem im Plasma gefundenen Aktivator in seinem physikalisch-chemischen Verhalten und kann sogar getrennt werden. Bei saurer Reaktion verträgt er z.B. Erhitzen bis 100° C und ist bei niederen Temperaturen auch in weiterem pH-Bereich stabil. Dieser Gewebeaktivator wird allgemein als Fibrinokinase bezeichnet und soll an die Mikrosomen gelagert sein, weshalb er normalerweise erst beim Zellzerfall in die Blutbahn gelangt (2).

In verschiedenen Organextrakten ergab sich in weitgehender Übereinstimmung der Untersucher (Halse 1948, Permin 1949, Bierstedt 1954, Astrup 1955, Müllertz 1956)(2) etwa folgende, im Konzentrationsgehalt absteigende Reihe in Aktivatoreinheiten pro Gramm Gewebe (*):

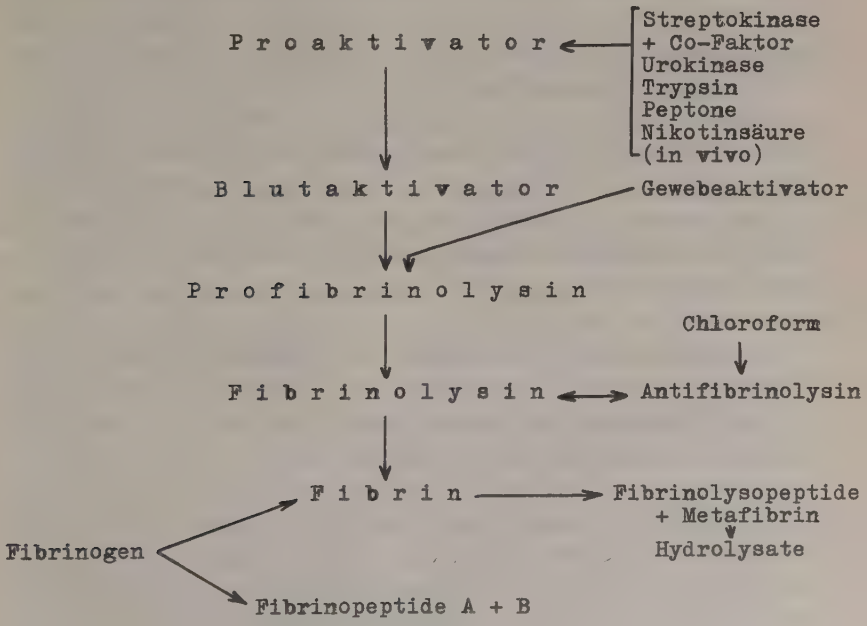
Uterus	720	Niere	119
Nebennierenmark	410	Muskulatur	110
Lymphknoten	378	Herz	82
Prostata	334	Hirn	35
Thyreoidea	325	Testes	25
Lunge	223	Milz	20
Ovarien	210	Leber	0
Hypophyse	140		

Milch-, Tränen- und Speichelflüssigkeit enthalten ebenfalls Aktivatoren, die sich von dem des Blutes unterscheiden. Selbst innerhalb eines Organtraktes ergaben sich wesentliche Unterschiede im Aktivatorengehalt, wie Ladehoff (58) von den harnableitenden Geweben berichtet. Dabei nimmt die Konzentration von der Nierenrinde über Papillen und Becken zum Ureter hin zu. Es ist interessant, daß der Mensch in seinem Aktivatorengehalt der Gewebe an der Spitze der Tierreihe steht (8).
Zu den körpereigenen Aktivatoren gehören noch die Urokinase (Astrup, Sterndorff 1952) und das Trypsin (Sherry, Alkjaersig 1957). Erstere ist wegen der zerstörenden Wirkung des Uropepsins im sauren Harn wenig stabil.

Seit der Entdeckung der fibrinolyseinduzierenden Eigenschaft bestimmter Bakterien von Tillett und Garner 1933 (52), war der Wunsch naheliegend, das aktivierte Ferment zur Therapie thrombotischer Erkrankungen heranzuziehen. Als besonders wirksam erwies sich dabei die S t r e p t o k i n a s e , die auf den inaktiven Proaktivator einwirkt, der dann als aktives Enzym seinerseits das Profibrinolysin in das Fibrinolysin umwandelt. Wegen der streng fermentspezifischen Aktivierungsfähigkeit muß nach Alkjaersig (3) noch ein Co- Faktor im menschlichen Plasma gefordert werden. Die Streptokinase selbst hat auf das Profibrinolysin keinen Einfluß. Im Gegensatz zum menschlichen Blut ist der Aktivierungseffekt beim tierischen Blut viel ge-

ringer, obwohl durch andere Aktivatoren ein genügender Profibrinolysingehalt nachgewiesen werden konnte (7).
Auch die besonders von Lewis und Ferguson (59) studierte S t a p h y l o k i n a s e erziehlt ähnliche Wirkungen, jedoch mit unterschiedlichem Effekt im Vergleich zur Streptokinase und dem Gewebeaktivator.
Durch die Versuche von Weiner, Crinis und deren Mitarbeiter (90) war bekannt geworden, daß durch die gefäßaktiv wirkende N i k o t i n s ä u r e beim Menschen eine Fibrinolyse in vivo induzierbar war. Diese Fibrinolyseaktivierung war nicht bei Hunden, Schweinen und Hasen zu erreichen. Weitere vasomotorische Substanzen wie z.B. das Nikotinamid, Histamin, Papaverin usw. zeigten keinen Einfluß. Ferner können P e p t o n e in höherer Konzentration sowohl in vivo als auch in vitro Fibrinolyse erzeugen, vermutlich ebenfalls über einen Profibrinolysinaktivator (7).

Zusammenfassend ergibt sich aus den obigen Erkenntnissen ein dem Gerinnungsschema ähnliches Fibrinolyseschema mit seinem komplizierten Wirkungsmechanismus:



F i b r i n o l y s e t h e r a p i e :

Für den Therapieerfolg ist die Umwandlungsgeschwindigkeit eines Gerinnungsthrombus in organisiertes Gewebe von Bedeutung. Nach histologischen Untersuchungen von Back, Ambrus, Simpson und Shulman (12) beginnt bereits am dritten Tag nach dem Ereignis eine Endothelüberwucherung von der Gefäßwand aus und am zehnten Tage danach die Vaskularisation. Diese Ergebnisse stimmen mit den therapeutischen Erfolgen überein, wobei sich eine Fibrinolysininfusionstherapie nach den ersten drei Tagen als aussichtslos erwies. Die Therapiekontrolle erfolgte ähnlich wie von Sawyer, Fletcher, Alkjaersig und Sherry an Hand von isotopenmarkierten (J^{131}) Gerinnseln (4,79).

Bei der Aktivierung der Fibrinolyse durch Lipopolysaccharide aus verschiedenen Bakterien, z.B. Salmonella abortus equi (46,64), Escherichia coli (64) oder Streptococcus hämolyticus (Streptokinase) empfiehlt Deutsch (34) wegen der unterschiedlichen Empfindlichkeit der einzelnen Patienten auf diese Bakterienfermente, einen vorausgehenden S t r e p t o k i n a s e r e s i s t e n z - Test als in vitro Reaktion. Er kommt dabei durchschnittlich auf errechnete klinische Gesamtdosierungen von ca. 5o ooo Einheiten sofort und anschließender Infusion von ca. 2oo ooo Einheiten über vier Stunden. Damit liegt er etwa bei den Werten von Alkjaersig (4), der eine Plasmakonzentration von mindestens 30 E/ml fordert, da wegen der teils hohen Streptokinaseantikörperbindungskraft bei niedrigeren Werten nicht mit einer Aktivierung zu rechnen ist.

Für die therapeutischen Versuche mit Humanfibrinolysin aus Plasmafraktionen -(Kline gelang die kristalline Herstellung von Profibrinolysin)- werden Mengen von 3o - 5oo ooo Einheiten (16), 5o - 1oo ooo E (88) und 1oo - 3oo ooo E/die (6) als Dosis angegeben. Davies (29) verwendet 5o - 1oo ooo E (Mercks Fibrinolysin) in 5 % iger Glucoselösung als Infusion über 1/2 - 2 Stunden.
Zur Überwachung der Fibrinolysekonzentration im Plasma sind nach Villavicencio und Warren (88) die empfindlichstem

Methoden mit Euglobulinfraktionen (mit natürlichem oder künstlichem Substrat), gefolgt von der Spontanlyse, während die Fibrinplattenmethode nach Astrup zur Therapiekontrolle zu unempfindlich ist. Von 17 Patienten blieben unter ihrer Fibrinolysintherapie 8 ohne Erfolg.
Während Beller (16), Alkjaersig (4) u.a. eine Thrombolyse nur durch Aktivierung des in das Gerinnsel eingeschlossenen Profibrinolysins für möglich hielten (Autodigestion), konnte Ambrus und Back (5) nachweisen, daß das Gerinnsel eine selektive Adsorptionsfähigkeit gegenüber dem Fibrinolysin besitzt. Sie arbeiteten mit radioaktiviertem Material und applizierten in Tierversuchen einen Fibrinolysin - Antifibrinolysinkomplex. Dadurch konnten sie den vermutlich proteolytischen Einfluß des Fibrinolysins auf die übrigen Gerinnungsfaktoren aufheben und es reicherte sich nur das Fibrinolysin in dem Gerinnsel an.

N e b e n w i r k u n g e n :

Die bei der Therapie oft erheblichen Nebenwirkungen wie Fieberanstieg um durchschnittlich 1° C und mehr, Blutdruckabfall, Schwindel und Erbrechen, Gesichtsröte, Schüttelfrost und andere subjektive Beschwerden (6,29,33,79) lassen sich durch antipyretische und antiallergische Medikation vermindern. Die bei der Behandlung gelegentlich zu beobachtende gesteigerte Gerinnungsfähigkeit, evtl. als Ausdruck einer Gegenregulation zu deuten, wird von den Autoren durch Heparingaben von ca 10 000 E i.v. kompensiert. Nach v. Kaulla, McDonald (51) oder Beller (16) wird bei dieser kombinierten Behandlungsmethode die Fibrinolyse durch hohe Heparindosen gehemmmt, während geringe Dosen, weniger als 100 Mikrogramm, eine Steigerung bewirken sollen.
Von verschiedenen Autoren (4,15,78) wird unter der Therapie auch ein Fibrinogenabfall beobachtet, der vermutlich als Fibrinogenolyse gedeutet werden kann, die jedoch von Back, Ambrus, Simpson und Shulman (12) geleugnet wird. Sandberg (78) bekommt mit dem Abfall des Fibrinogens unter der Therapie eine gleichzeitige Verminderung des Antifibrinolysins. Nach Shulman wird dieser Inhibitor für identisch mit dem Trypsininhibitor gehalten.
Weiner und Mitarbeiter (90) erhalten unter Nikotinsäure-

injektionen von lo - loo mg keine Beeinflussung der Gerinnungsfaktoren, während Deutsch (34) bei Streptokinaseapplikationen von einer Fibrinogenabnahme und Thrombinzeitverlängerung, Hörder (46) von einem Faktor-V Anstieg, Verkürzung der Gerinnungszeit und Antithrombinverminderung berichten. Nach Beller und Glas (15) bleiben die Faktoren II, V, VII, VIII, IX des Gerinnungsschemas unbeeinflußt, während Deutsch (33) und Koller (52) neben der Veränderung anderer Proteine auch eine Aktivitätsabnahme der Faktoren V, VII, und VIII nachweisen konnten. Die Spaltprodukte des Fibrins sollen nach Deutsch (33) eine deutliche Antithrombinaktivität besitzen.

I n h i b i t o r e n des Fibrinolysins:

Schon Rosemann (aus 3o) konnte aus Pleuraexsudat und aus Serum einen Hemmstoff des fibrinolytischen Fermentes abtrennen. Genauere Untersuchungen von Norman (71) ergaben eine Trennung des Antifibrinolysins in einen leichtdissoziierbaren "immediate"- Inhibitor und einen temperaturempfindlicheren "slow"- Inhibitor. In späteren Arbeiten von ihm (72) konnte er den "slow"-Inhibitor aus der $Alpha_1$- und den "immediate"- Inhibitor aus der $Alpha_2$-Elektrophoresezone gewinnen. Die Ferment - Inhibitorverbindung wird allgemein als stöchiometrisch (82,30) vermutet, wobei in normalem Plasma ein 30facher Inhibitorbindungsüberschuß zum Eigenfibrinolysin vorhanden ist.(70, 77.) Zum Zustandekommen einer Spontanfibrinolyse ist demnach eine Verschiebung dieser Relation zu Gunsten des Fermentes notwendig. Ein teilweise noch ungeklärter Effekt in dieser Richtung kann durch Verdünnen des Plasmas erreicht werden, wobei der Inhibitor wahrscheinlich früher in einen inaktiven Konzentrationsbereich kommt und dadurch unwirksam wird.

Als körpereigene Substanzen scheinen die Thrombozyten auch einen Einfluß auf die Fibrinolyse im Sinn einer Hemmung ausüben zu können. Zu diesem Ergebnis kamen Bierstedt (17), Sherry, Alkjaersig (82) und Hougie, Ayers (47), jedoch ließ sich dieser Effekt nicht durch Phospholipide erreichen (47,65), die sonst in Form des Kephalins die

Thrombozyten im Gerinnungsvorgang weitgehend ersetzen können. Nach Bayerle und Kammhuber (13) besitzen auch die Erythrozyten einen artunspezifischen Inhibitor, während Permin (73) besonders im menschlichen Erythrozytenstroma einen sehr intensiven Aktivator nachweisen konnte. Deutsch hält (33) auch in den Leukozyten einen Aktivator für möglich, dessen Freisetzung durch die kurzzeitige Leukopenie nach Pyrogeninjektionen erklärt werden könnte.

Für biochemische Untersuchungen und zur Therapiebeherrschung erwies sich die Epsilonaminocapronsäure als spezifischer Fibrinolyseinhibitor. Genauere Untersuchungen darüber stammen von Sjoerdsma, Nilsson und Inga (85), die unter verschiedenen Alphaaminosäuren die aktivsten Verbindungen bei Carbonkettenlängen von 4 bis 8 und der Aminogruppe in Omegastellung erhielten. Die beiden aktivsten Substanzen waren die Epsilonaminocapron- und die Alphaaminovaleriansäure. Im Organismus konnten diese beiden Substanzen bis jetzt nur im Speichel von Patienten mit Periodontitis gefunden werden.

Durch in Vitro Versuche von Ablondi und DeRenzo (1) konnte, ähnlich wie bei Ambrus und Mitarbeiter (5), nachgewiesen werden, daß dieser Inhibitor nicht die Auflösung eines präformierten Gerinnsels verhindern kann, da er im Gegensatz zum aktivierten Fibrinolysin nicht adsorbiert wird. Inwieweit dieser Effekt therapeutisch verwertbar ist, bleibt abzuwarten.

Durch die Verwendung der Epsilonaminocapronsäure zur Fibrinolyseunterbrechung zu beliebigem Zeitpunkt konnten die Japaner Katsuhiro ~~M.~~ Keiji und ~~M.~~ A. (49) einige biochemische Fragen klären. Sie teilen den Vorgang in zwei Phasen ein, wobei in der ersten Fibrinolysopeptide und Metafibrin entstehen, während sich in der zweiten aus dem Metafibrin Hydrolysate bilden. Das entstehende Metafibrin soll in quantitativ konstantem Verhältnis von 1 : 2 Thyrosin und Asparaginsäure als endständige Aminosäure enthalten. Den Gerinnungsvorgang erklären sie durch die enzymatische Abspaltung von Fibrinopeptiden A und B von dem Fibrinogenmolekül durch das Thrombin, wobei Fibrin übrigbleibt.

P h y s i k a l i s c h - c h e m i s c h e E i g e n s c h a f t e n :

Bekanntlich liegt unter normalen Bedingungen das Fibrinolysin (auch Plasmin genannt) nicht in aktiver Form im Plasma oder Serum vor, sondern in einer inaktiven Vorstufe als P r o f i b r i n o l y s i n (Plasminogen). Dieses verhält sich wie ein Globulin (73) und soll ein Lipoproteid sein, das durch milde Entfettung (Chloroform) aktiviert werden kann. Im Gegensatz zum aktiven Enzym ist es physikalisch-chemischen Einflüssen gegenüber relativ stabil und ist bei 3° C einige Tage haltbar.

Wie die meisten Fermentaktivitäten wird auch das F i b r i n o l y s i n in Einheiten gemessen, wobei man unter einer Loomiseinheit die notwendige Fermentmenge versteht, die o,6 ml eines o,3 %igen Rinderfibrinogengerinnsels bei 45° C in zwei Minuten bei pH 7,2 zu lösen vermag. Im menschlichen Plasma befinden sich bei maximaler Aktivierung 4oo - 9oo Einheiten/ml.
Freimann und Cliffton (4o) geben für den günstigsten pH-Bereich den Wert von 7,4 und Markus und Ambrus (63) für thrombingeronnenes Substrat den Wert pH 8,o an. Von Fearnley und Lackner (37) werden für thrombingeronnenes Plasma 7,4 und für $CaCl_2$-geronnenes 8,6 als pH-Optimum angegeben. Während der Lyse scheint in nicht gepuffertem Milieu eine pH-Verschiebung zur alkalischen Seite mit Beeinflussung der Reaktionsgeschwindigkeit stattzufinden. Wegen der geringen Haltbarkeit des Fermentes bei Körpertemperatur hat sich die Methode von Fearnley (37) für die Fermentbestimmung eingebürgert, in der das Blut sofort nach der Entnahme eisgekühlt wird. Im Gegensatz dazu ist die Vorstufe des Fermentes, das Profibrinolysin, weniger temperaturempfindlich. Erwärmen auf 56° C über eine halbe Stunde verträgt es ohne Aktivitätsverlust, während das aktive Ferment bei dieser Temperatur in 5 - 10 Minuten zerstört wird.(73).In 50 %igem Glycerin läßt sich nach Alkjaersig und Mitarbeiter (3) die Stabilität des Fibrinolysins so gut steigern, daß die Au-

toren erst nach 20 Monaten einen Fermentaktivitätsverlust von nur 20 % des Ausgangswertes feststellen konnten. Zur Spontanaktivierung benötigt das glycerinstabilisierte Plasma bis zum Erreichen des Maximums bei 22° C 8-12 Tage und bei 37° C 3-4 Tage, jedoch mit größerer Stabilitätseinbuße.

Einen gewissen Einfluß scheint auch die Ionenkonzentration des Lösungsmilieus zu spielen. So berichten Auerswald und Doleschel (11) von der Möglichkeit der Spontanaktivierung durch hohe Salzkonzentrationen. Zu den gleichen Ergebnissen gelangt Weiner (89), der in hypertonen Kochsalz- und Phosphatlösungen 100 %ige Lyse erhält. Damit wäre vielleicht die von Buckell (21), Astrup und Sterndorff (10) gefundene Aktivitätssteigerung durch Citrat und Fumarsäure zu deuten.

Keinen Einfluß auf die Fibrinolyse konnten Alkjaersig und Fletcher (3) durch Lösungen von o,ol - o,5 molarer Jonenstärke nachweisen und Buckell und Truscott (24) kamen sogar zu einem gegenteiligen Ergebnis: sie erhielten mit zunehmender Salzkonzentration (0 - 1 %) abnehmende Fibrinolysequoten.

Einen noch ungeklärten Mechanismus bildet die Möglichkeit der Fibrinolyseaktivierung durch Magnesiumionen in Form seiner Salze. Dieser Vorgang läuft nur in vivo ab und wurde von Rybak (76) therapeutisch als Kombinationsbehandlung mit Fibrinolysin ausgenützt. Bei der elektrophoretischen Reinheitskontrolle des durch Magnesiumionen aktivierten Fibrinolysins ergab sich eine einzelne Zacke in der Nähe der Betaglobuline. Damit liegt das Ferment in der bereits von Macfarlane und Biggs (61) vermuteten Plasmafraktion. Sie hatten aus der Verschiebung des Albumin - Globulinquotienten bei der Alarmreaktion nach Selye und der damit verbundenen gesteigerten Fibrinolyse auf die sinngemäße Lage von Fibrinolysin und Antifibrinolysin geschlossen. Nach Davies und Englert (28) besitzt das isolierte Fibrinolysin in Übereinstimmung mit Shulman (84) eine elektrophoretische Wanderungsgeschwindigkeit von 2 $cm^2 Volt^{-1} sec^{-1}$.

Die speziellen Untersuchungen von Norman (70) ergeben eine Lage des Profibrinolysins zwischen der Beta- und

Gammazacke, näher der letzteren. Nicht in Übereinstimmung damit sind die Versuche von Astrup zu bringen, der in je einem Fall von Agammaglobulinämie wie Makroglobulinämie gleiche Lysezonen bei seiner Methode erhält.
Neben dem auf rund 84 ooo geschätzten Molekulargewicht sind nach den Untersuchungen von Davies und Englert (28) von den physikalischen Konstanten das spezifische Gewicht mit o,71 ,die Sedimentations- (4,3 S), Diffusions- und Viskositätskonstante bekannt.

Experimenteller Teil:

Die vorliegende Arbeit machte es sich zur Aufgabe, das fibrinolytische System bei Arteriopathien, speziell im Bereich der unteren Extremitäten, zu untersuchen. Als Methode wählten wir die Spontanfibrinolyse nach Macfarlane und Biggs (60) in leicht modifiziertem Ansatz, die uns wegen des geringen Eingriffs in das biologische System als besonders geeignet erschien.

Verwendete Materialien:

1. Natriumcitrat 3,8 %, neutral
2. isotonische sterile NaCl-Lösung 0,9 %
3. Diäthylbarbitursäurepuffer pH 6,7 + 7,6 (Behring)
4. Rinderfibrinogen (Behring)
5. Standard Normal Plasma SNP (Dade)
6. Varidase^{R}(Lederle),setzt sich zusammen aus 2o ooo E Streptokinase und 5 ooo E Streptodornase. Die angegebenen Einheiten beziehen sich jeweils nur auf die Streptokinase.
7. Liquemin (Heparin, Roche)
8. Thrombocid (Bene Chemie)
9. Heparinoid SP 54 (")
10. Chromatography Paper, engl. Fabrikat,gerichtet (28,5x3,9 cm)

Methode:

Das Citratblut (1 : 10) stand nach der Entnahme (zwischen neun und elf Uhr morgens) ca 1 - 2 Stunden bei 5 - 10° C im Kühlschrank und wurde dann fünf Minuten bei 3 5oo U/min zentrifugiert. Von dem so erhaltenen Citratplasma wurden Verdünnungen mit Diäthylbarbitursäurepuffer pH 7,3 von 1 : 32, 1 : 64, 1 : 128 hergestellt; das Endvolumen betrug jeweils 1,6 ml.
Nach Zugabe des in Aqua bidest. gelösten Thrombins(2o NIH E/ml) von jeweils 2 Tropfen (=0,1 ml) für die Ansätze 1 : 32 und 1 : 64 und je einem Tropfen für 1 : 128,wurden die Reagenzgläser zur Durchmischung vertikal kurz rotiert und dann 22 Stunden in ein Wasserbad von 37° C gestellt. Die Gläser waren verkorkt und konnten als steril bezeichnet werden. Gegenüber dem normalen Thrombinäquivalent bei der sogenannten Thrombinzeitbestimmung (0,6 ml Thrombin 2o E/ml auf 0,2 ml Plasma) liegen die angegebenen Werte (0,6 ml Thrombin 2o E/ml auf 0,094 ml Plasma) über doppelt so hoch; trotzdem war wegen des Verdünnungseffektes eine Gerinnung erst nach 3 - 5 Minuten zu beobachten.
In Thrombinverdünnungsreihen von 10 bis o,o15 NIH E/ml war ab o,125 E/ml noch nach 6o Minuten keine Gerinnselbildung im Ansatz 1 : 64 bei Konstanz der anderen Reaktionsteilnehmer zu sehen. Erst nach 20 Stunden war ein schwaches Gerinnsel nachweisbar. Bei den noch geringeren Konzentrationen ließ sich nach 20 Stunden bei erneuter Thrombinzugabe (20 E/ml) noch Gerinnung auslösen, jedoch nicht so intensiv wie bei primärer Gerinnung.
Der verwendete Standardansatz -(bei Plasmaverdünnung 1:64 = 2 NiH E/0,015 ml Plasma)- enthält damit etwa das 16-fache einer gerade noch ein Gerinnsel erzeugenden Thrombinmenge. Wahrscheinlich wäre bei geringerer Thrombinzugabe auch eime geringere Spontanlysequote zu erwarten gewesen, wenn das verwendete Thrombin, was anzunehmen ist, selbst proteolytisch wirkt (81).Andererseits zeigten Thrombinspontanlysen mit Standard Normalplasma SNP keine Lysen. Alle Gerinnsel waren homogen und zeigten nur noch angedeutete Retraktion, vor allem in den höheren Verdünnungen, was das Ablesen sehr erleichtert e.

In Parallelansätzen dazu wurde mit je 0,1 ml einer m/x-Kalziumchloridlösung die Plasmaverdünnung 1 : 64 zur Gerinnung gebracht:

Mit	m/4o	Lösung	wurden	angesetzt	(1:64)	141 Probanden
"	m/80	"	"	"	"	76 "
"	m/1oo	"	"	"	"	14 "
"	m/12o	"	"	"	"	11 "
"	m/8o	"	"	"	(1:128)	5o "

Bei der Ausfällung mit m/1oo und m/12o $CaCl_2$ zeigten sich durchwegs "Lysen" nach 24 Stunden, die jedoch bei Thrombinzugaben deutliche Nachgerinnung ergaben. Bei den höheren Kalziumkonzentrationen -(bei dem Ansatz mit einer m/4o Lösung ist der Überschuß bei einer Plasmaverdünnung von 1:64 im Vergleich zur Fibrinogenbestimmung 4 : 1)- zeigte sich keine einzige Lyse.
Alle Ansätze, sowohl mit Thrombin wie mit Kalziumchlorid, wurden prinzipiell als Parallelansätze angesetzt und die Ergebnisse waren ohne Ausnahme jeweils übereinstimmend.
Als Lysen bei der Auswertung der Thrombinansätze wurden nur Totallysen gerechnet, also ohne jeglichen Rückstand, obwohl gelegentlich auch angedeutete Lysen mit geringem Bodensatz zu unterscheiden gewesen wären.

Ergebnisse

der Spontanfibrinolysen mit Thrombingerinnung:

Von den 557 Ansätzen mit Plasmaverdünnung 1:64 waren insgesamt 16o Totallysen (Lysenquote 29%) zu verzeichnen, wobei angedeutete Lysen nicht berücksichtigt wurden.
Eine Aufteilung dieser Zahlen nach Alter und Geschlecht, ohne jegliche Spezifizierung, also Obliterationspatienten und "Gesunde" zusammengefaßt, ergibt:

	männlich			weiblich		
	Gesamtansätze	davon Lysen	Lysequote	Gesamtansätze	davon Lysen	Lysequote
16 - 5o J:	119	48	40%	85	36	41%
51 - 85 J:	290	62	21%	63	14	22%

Trifft man eine Aufteilung nach klinisch durch Aortographie gesicherten Obliterationen, so resultieren folgende Zahlen:

Gesamtzahl der Obliterationen: 157 Männer und 1o Frauen.
Davon 11o unter längerer Marcumarbehandlung mit 13 Lysen(12%)
57 unter längerer Ovestin-Behandlung mit 1o Lysen(18%)

Das Durchschnittsalter der 157 männlichen Obliterationspatienten war 61 Jahre; die Lysequote betrug 15%.
Die Gegenüberstellung von 55 "gesunden" Vergleichspersonen mit dem gleichen Durchschnittsalter von 61 Jahren ergab eine Lysequote von 26 %. Wie die Abb.1 zeigt, liegt die Lysequote bei den Jugendlichen mit einem Durchschnittsalter von 31 Jahren bei 42 %.
Um eventuelle Abhängigkeiten der Spontanlysenquote vom jeweiligen Fibrinogengehalt des Plasmas zu erfassen, wurden in 81 Fällen der Fibrinogengehalt festgestellt und gleichzeitig Parallelbestimmungen nach der Methode von Marbet (62) durchgeführt. Bei dieser Methode wird streptokinaseinkubiertem Plasma Thrombin zugegeben und durch auf das Gerinnsel gestreuten Sand die Zeit bis zur Gerinnselauflösung bestimmt. Diese Marbet - Zeiten lagen zwischen 5o und 1oo Sekunden, bei Fibrinogenamplituden von 2oo bis über 5oo mg%. Die Spontanlysen sind ohne erkennbaren Trend über diesen Bereich verteilt und es konnte kein Zusammenhang dieser Größen gefunden werden. Bei der Abb. 2 enthält ein Kreis jeweils alle drei Werte (die schwarzen Punkte bedeuten Totallysen).

In vitro-Versuche mit Zusatz von Gerinnungshemmern:

1. Heparin (Liquemin):
   Das Ansatzvolumen betrug zusammen mit dem Gerinnungshemmer und dem Thrombin wieder 1,7 ml bei einer Verdünnung des Plasmas von 1:128 (o,4ml Plasmaverd.1:32, o,7ml Puffer, o,1ml Thrombin,o,5ml Gerinnungshemmer)
   Die Liqueminzusätze erfolgten immer 1o min nachder Thrombinzugabe, also nach erfolgter Gerinnung und zwar in folgenden Konzentrationen: 5o, 25, 1o, 1, o,1 E/ml.

Ergebnisse der Spontanfibrinolyse-Untersuchungen bei Patienten und gesunden Vergleichspersonen

Abb. 1

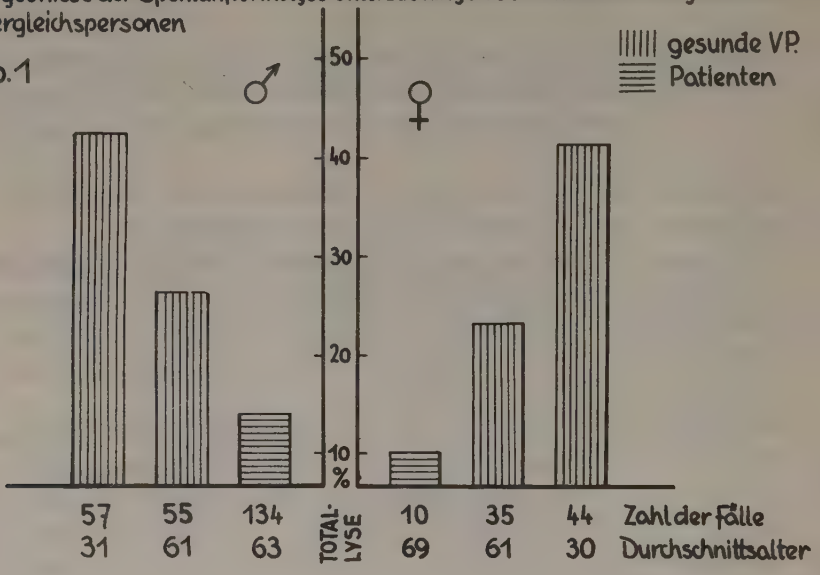
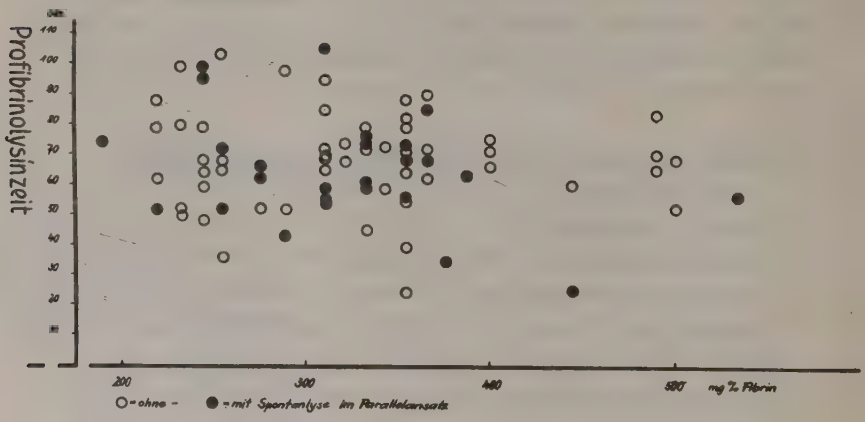


Abb. 2 Beziehungen zwischen Fibrinogengehalt, Profibrinolysinzeit (Marbet) und Spontanfibrinolyse



Von den 6 Ansätzen zeigten 5 Personen weder im Spontan-, noch im Liqueminansatz Lyse, eine Versuchsperson nur im parallelen Spontanansatz. Wurde das Liquemin in gleichen Konzentrationen vor dem Thrombin zugegeben, so kam es nicht zur Gerinnung.

2. Thrombocid:
Ansatz wie oben mit folgenden Verdünnungen des Thrombocids: 25; 10; 5; 1; 0,1; bzw. 25; 2,5; 0,25; o,o25 und o,oo25 mg/ml. Von den 20 Versuchspersonen hatten 8 im Spontanansatz Lysen und alle Parallelansätze mit Thrombocid waren ohne Lysen. Bei Zugabe von Thrombocid in gleichen Konzentrationen vor dem Thrombin kam es selbst bei einer Menge von nur o,oo25 mg pro ml nicht zu einer Gerinnung.

3. Heparinoid SP 54:
Ansatz wie oben mit folgender Verdünnungsreihe: 50 - o,oo25 mg pro ml. Dabei 28 Spontanlysenansätze mit 12 Spontanlysen und keine einzige Lyse in den Parallelansätzen mit SP 54.
Bei Zugabe vor dem Thrombin wie oben ebenfalls keine Gerinnung.

4. Intramuskuläre Applikation von Thrombocid und SP 54:
Drei Versuchspersonen erhielten dreimal wöchentlich insgesamt je sechs Injektionen von 1 ccm Thrombocid Depot zu 3oo mg. Eine Versuchsperson erhielt SP54 in denselben Abständen. Die Ergebnisse vor und nach den Injektionen waren so variabel (-,+,-,+,-,-,), daß ein therapeutischer Fibrinolyseeffekt für diese Medikamente nicht zu erkennen war.
Ergebnis:
Für die drei oben genannten Medikamente Liquemin, Thrombocid und Heparinoid SP 54 konnte weder durch in vitro noch durch in vivo Versuche ein fibrinolyseinduzierender Effekt nachgewiesen werden.

F e t t b e l a s t u n g :

26 Versuchspersonen bekamen 25o bzw. 375 ml Rahm mit 33% Fettgehalt, 62,5 g Butter und ein bis zwei Brötchen. Je 2o ccm Blut (1 : 10 Citrat) wurde vor und 3 1/2 Stunden

nach der peroralen Fettbelastung entnommen, wobei das zweite Plasma immer stark lipämisch war. Von den 26 Versuchspersonen hatten drei bereits ohne Fettgaben deutliche Lysen, während nach der Fettbelastung in dem oben geschilderten Ansatz 19 eine komplette Lyse nach 24 Stunden zeigten. Die Fettbelastung schien in unserer Versuchsanordnung die Lysebereitschaft zu steigern. Bei 10 Personen wurden nach der zweiten Blutentnahme 5000 E Heparin i.v. injiziert. Bei den acht Minuten später entnommenen Blutproben war die Lipämie noch vorhanden. Der bekannte Lipämie-Clearance Effekt des Heparins hatte sich in dieser wahrscheinlich zu kurzen Zeit nicht auswirken können und die angesetzten Spontanlysen zeigten unveränderte Ergebnisse.

Trotz Konstanthaltung aller beeinflußbaren Laborfaktoren konnte es nicht gelingen, bei Mehrfachbestimmungen an einem Patienten zu verschiedenen Zeiten immer übereinstimmende Ergebnisse zu bekommen. Bei 47 Doppelbestimmungen an verschiedenen Tagen stimmten nur 39 Probanden in ihren Ergebnissen überein, bei 16 Dreifachbestimmungen waren es 12. Damit mußten wir die schon von Buckell und Elliot (23) berichteten Erfahrungen bestätigen, daß an verschiedenen Tagen beträchtliche Unterschiede möglich sind. Die genannten Autoren bekamen sogar einen Tagesrhythmus mit einem Aktivitätsanstieg von 8 - 11 Uhr vormittags. Bei der einmaligen Ablesung nach 22 Stunden waren wir uns bei diesen Aktivitätsschwankungen der Ungenauigkeit der Methode bewußt und haben ihr deshalb, um objektiv bleiben zu können, nicht mehr als eine Ja-Nein Aussage zugemutet. Wie die Ergebnisse zeigen, war diese Vereinfachung durch die große Zahl der Untersuchungen von über 550 Ansätzen gerechtfertigt, die eine Differenz von beinahe 100 % in der fibrinolytischen Aktivität von Obliterationspatienten zu gesunden Vergleichspersonen ergeben und somit eine Signifikanzberechnung erübrigen.

Diskussion:

Eine Untersuchung von Personen mit nachgewiesener Arteriosklerose in Hinblick auf die sogenannte vierte Phase des Blutgerinnungsschemas, der Fibrinolyse, schien uns insofern gerechtfertigt, als diese Patienten zu thrombotischen Verschlüssen im Gefäßsystem neigen. Wie die Ergebnisse zeigen, ist das fibrinolytische Potential bei diesem Patientengut deutlich vermindert.

Die Entstehung von Thromben und die damit schon von Virchow und Rokitansky (8) erwogene Begünstigung sklerotischer Prozesse kann also nicht nur durch eine gesteigerte Gerinnungsbereitschaft des Blutes, wie der Heparintoleranztest hat zeigen können (91,92,93), sondern ebenso durch ein vermindertes fibrinolytisches Potential erklärt werden.

Die Thrombenbildung bei herabgesetzter Fibrinolyse scheint auch insofern begünstigt zu sein, als es nicht ausgeschlossen ist, daß schon physiologischerweise der Abbau des Fibrinogens -(nach Gerdes und Maurer beträgt die Lebensdauer ca 3 Tage und Remde gibt eine Halbwertszeit von 6 Tagen an (45)- in mikroskopischen Dimensionen unter Einschaltung des Lysefermentes erfolgt.

Mit einer sehr eleganten Methode, nämlich durch Auflegen von histologischen Gefrierschnitten auf Fibrinplatten,- ähnlich der Astrup Methode,- konnte Todd (87) einen unterschiedlichen Gehalt von Fibrinolyseaktivatorsubstanzen im perivaskulären Gewebe von Arterien und Venen zu Gunsten der letzteren feststellen.Ebenso erhält Bierstedt (19) bei spontanaktivem Venenblut etwa in 3o% inaktives Arterienblut. Astrup (8) erklärt diese Differenz aus dem unterschiedlichen Gefäßbau von Arterien und Venen (vasa vasorum). Den experimentellen Beweis zu den Vorstellungen von Virchow und Rokitansky (s.o.) konnte Duguid und seine Mitarbeiter(35) bringen, die auf dem Boden künstlich gesetzter Thromben tatsächlich sklerotische Plaques in den Gefäßwänden erzeugen konnten. Zusammenfassend ließe sich aus der geringeren fibrinolytischen Aktivität im arteriellen Blutstromgebiet und aus den letztgenannten Experimenten wenigstens eine Komponente an der vieldiskutierten Prädilektion sklerotischer Prozesse an den Arterien erklären.

Die Untersuchungen von Lackner (57) unmittelbar nach akutem Herzinfarkt (Methode nach Fearnley und Euglobulinlysezeit) brachten beträchtliche Fibrinolyseaktivitätsschwankungen und eine allgemein verminderte Lyse in der Zeit bis zu drei Tagen nach dem Ereignis. Bei gleichen Untersuchungen findet Sandberg (78) bei Patienten mit akutem Myokardinfarkt und mit thromboembolischen Zuständen einen erhöhten Antifibrinolysingehalt, der durch eine spezifische Therapie erniedrigt werden konnte. Dieser Inhibitor wird, wie bereits oben erwähnt, nach Shulman für identisch mit dem Trypsininhibitor gehalten. Eine verminderte Euglobulinfibrinolyse und eine statistisch gesicherte Verlängerung der Streptokinaseaktivierten Vollplasmafibrinolysezeit erhält Czarniecki (27) bei seinen Untersuchungen eines größeren Patientengutes mit gesicherter Arteriosklerose; auch er diskutiert die Möglichkeit eines erhöhten Antifibrinolysingehaltes.
Die gleichen Ergebnisse teilen Sherry, Fletcher, Alkjaersig, Sawyer (83,79) und Camerada (25) mit. Letzterer kommt bei seinen in vitro Versuchen ebenfalls zu einer verminderten fibrinolytischen Aktivität bei Patienten mit Arteriosklerose und erreicht unmittelbar nach dem Verschlußgeschehen statistische Signifikanz. Auch er versucht embolische Verschlüsse durch verminderte Fibrinolyse zu erklären.
Bei Vergleichsuntersuchungen von Nestel (67) an Patienten mit Claudicatio intermittens Beschwerden und Kontrollpersonen ergeben sich Lysezeiten (Fearnley Methode) mit einer durchschnittlichen Verlängerung um 8,4 Stunden bei den Arteriopathien. Die Untersuchungen des Plasmas ergaben einen niedrigen Alpha/Betalipoproteinquotienten bei den Patienten.
Durch unseren Verzicht auf den aktivitätsstabilisierenden Einfluß der Plasmaabkühlung bei der Blutabnahme (Fearnley) wurde der Eintritt der Totallysen zeitlich hinausgeschoben. Der gewählte 22-Stundenwert ergab bei unseren Patienten mit obliterierenden Arteriopathien eine Lysequote (=Verhältnis von Totallysen zu angesetzten Untersuchungen in Prozent) von 14 % im Vergleich zu 25 % bei den altersgleichen "Normalpersonen" und 42 % bei den Jugendlichen. Das fibrinolytische Potential dieses Patientengutes ist also deutlich vermindert,

sei es auf Grund eines Fibrinolysinmangels bzw. einer Aktivierungsinsuffizienz oder bedingt durch einen erhöhten Inhibitorgehalt.
Der bereits oben erwähnte niedrige Alpha/Betalipoproteinquotient bei Patienten mit claudicatio intermittens stimmt gut mit den Untersuchungen von Greigh und Runde (43) überein, die die Betalipoproteine als den verantwortlichen Fibrinolyseinhibitor in den l i p ä m i s c h e n Plasmen vermuten. Greigh bekam nach fettreichen Mahlzeiten eine Hyperkoagulabilität und eine verminderte Fibrinolyse (44). Außerdem scheinen gesättigte Fettsäuren, wie zB. in der Butter, einen stärkeren Einfluß zu haben als die ungesättigten der Öle (43, 66, 80). Nach Mitchel und Sheila(65) werden die Cholesterinoleate, die 86 % des menschlichen Cholesterins ausmachen, an Hand von in vitro Versuchen für den Inhibitoreneffekt verantwortlich gemacht.
Duguid (35) konnte im Zusammenhang mit seinen bereits oben erwähnten Experimenten durch Cholesterinfütterung und den dadurch bedingten Inhibitoreffekt bei Kaninchen und Hunden nach einem 3/4 Jahr atheromatöse Gefäßveränderungen nachweisen. Buckell und Elliot (22) bekamen nur bei Jugendlichen mit ihrem "flexibleren" Fibrinolysesystem eine Hemmung von etwa drei Stunden nach Zufuhr von 50 Gramm Butter.

Wir selbst konnten mit der Methode von Macfarlane und Biggs, ebenso wie Nitzberg , Peyman, Goldstein,Proger(69), wie Jeffries mit Rattenversuchen (43) und wie Hougie und Ayers (47) keine Hemmung der Fibrinolyse nach der Fettbelastung erhalten, sondern bekamen unter unseren Versuchsbedingungen sogar eine Steigerung der Lysequote gegenüber den Vergleichsansätzen vor der Fettzufuhr.
Selbst Greigh (43) berichtet von "Ausnahmefällen" mit gesteigerter Fibrinolyse. Billimora und Mitarbeiter bekamen zunächst eine verminderte Fibrinolyse, die sich jedoch nach vier Stunden wieder auf den Ausgangswert eingestellt hatte (20). Es ist interessant, daß Buckell und Elliot (23) mit der Euglobulinmethode als dem spezifischsten Nachweis für das Fibrinolysin keinen Unterschied im Enzymgehalt bei Fettbelastung bekommen, womit sich der Effekt wiederum auf einen gesteigerten Inhibitorgehalt schieben ließe.

Um einen Einblick in den Einfluß der Lipämie auf das Gerinnungssystem zu bekommen, untersuchten Nitzberg und Mitarbeiter (32,69) Patienten mit Hypercholesterinämien, idiopathischer Hyperlipämie und Normalpersonen, nachdem Fullerton und Greigh (44) eine beschleunigte Gerinnungszeit nach Fettbelastung gefunden hatten. Es liefen jedoch alle Gerinnungstests unbeeinflußt ab, mit Ausnahme der Stypvenzeit (thromboplastisches Viperngift), die besonders bei den Normalpersonen nach dem Essen verkürzt war. Bei beiden Krankheitsbildern waren in den EKG-Befunden Veränderungen im Sinne von Ischämien als Ausdruck der Sklerose zu finden.
Kommerell (53) bekommt bei lipämischen Plasmen jedoch einen verkürzten Plasmathrombokinasebildungstest und eine damit verbundene Hyperkoagulabilität. Wir selbst versuchen die erhöhte Fibrinolyse bei unseren Ergebnissen teilweise als ein räumliches Verteilungsproblem zu erklären.
Bei der immerhin erheblichen Lipämie waren die Gerinnsel weit weniger homogen und stabil als in den Leerwerten. Auch war die Retraktion der Gerinnsel geringer, womit die schon oben diskutierte Bedingung der größeren Fermentangriffsfläche begünstigt wurde. Die Entstehung von Thromben und die damit möglichen sklerotischen Veränderungen auf der Basis einer essentiellen oder alimentären Lipämie sollte man deshalb vielleicht nicht auf ein Versagen der sogenannten vierten Phase des Blutgerinnungsschemas schieben, sondern eine Erklärung dafür eher in einer früheren Stufe dieses Schemas im Sinne einer Hyperkoagulabilität oder anderen Zusammenhängen zu finden versuchen.
In noch teilweise ungeklärter Weise greift auch das Heparin in den Fettstoffwechsel im Sinne einer Lipämie-"Clearance" ein.
In unseren in vivo Versuchen mit diesen Medikamenten (Thrombocid und Heparinoid SP 54) nach Fettbelastung war ein damit eventuell zu erwarten gewesener Einfluß, fibrinolysesteigernder oder senkender Art, nicht zu beobachten. Vielleicht war die Einwirkungsdauer von nur acht Minuten zu kurz.
Aber auch die Depotpräparate ließen selbst nach 14-tägiger Behandlung (darunter auch ein Fall von essentieller Lipämie) einen fibrinolyseinduzierenden Effekt missen.

Falls die Heparine überhaupt eine derartige Nebenwirkung auf die Fibrinolyse haben, über welchen Mechanismus sie auch immer gehen mag, wäre es denkbar, daß dieser sicher unterschwellige "Reiz" vom Organismus kompensiert oder sogar mit einer überschießenden Gegenregulation beantwortet wird.

Zusammenfassung der Ergebnisse:

1. Mit der Methode nach Macfarlane und Biggs konnten wir an insgesamt 557 Patientenuntersuchungen feststellen, daß Patienten mit obliterierenden Angiopathien im Vergleich zu altersentsprechenden Normalpersonen durchschnittlich eine um die Hälfte verminderte Fibrinolyseaktivität besitzen.

2. Aus der Altersaufteilung ergibt sich für die Jugendlichen (16 - 35 J) eine beinahe doppelt so häufige Spontanfibrinolyse wie bei den 5o - 85 jährigen.

3. Über Geschlechtsunterschiede sind wegen der relativ geringeren Zahl weiblicher Patienten keine sicheren Aussagen zu machen, obwohl die bisherigen Ergebnisse keinen Unterschied bei der Gegenüberstellung erkennen lassen.

4. Ein Zusammenhang zwischen Spontanlyse, der Profibrinolysinzeit nach Marbet und dem Fibrinogengehalt konnte nicht gefunden werden.

5. Für die Medikamente Liquemin, Thrombocid und Heparinoid SP 54 konnte weder durch in vitro noch in vivo Versuche ein fibrinolyseinduzierender Effekt nachgewiesen werden.

6. Bei Fettbelastung mit 1/4 Ltr. Rahm und 6o Gramm Butter konnte keine Fibrinolysehemmung erreicht werden, sondern es war eher eine Steigerung zu beobachten.

Beschreibung einer neuen Fibrinolysebestimmungsmethode (Papierfibrinolyse)

Bei der Durchsicht der bisher entwickelten Meßmethoden für fibrinolytische Aktivität lassen sich bei allen mehr oder weniger große methodische Bedenken anmelden. Dabei können diese zur Zeit grundsätzlich in drei Gruppen eingeteilt werden.

1. Die Bildung von Gerinnseln in Gegenwart von fibrinolytischen Fermenten; dabei sind nach der Gerinnung die Fermente über die gesamte innere Gerinnseloberfläche verteilt und wirken auf eine enorme Angriffsfläche ein, was unter Berücksichtigung natürlicher Verhältnisse unerwünscht ist. Das Arbeiten mit hochverdünnten Substraten führt zwar zur "Empfindlichkeitssteigerung", stört aber die natürlichen Verhältnisse Aktivator - aktiviertes Ferment - Inhibitor erheblich. Weitere Nachteile sind, daß diese Methoden bei Anwendung von heparinartigen Antikoagulantien meist versagen und daß, außer der Thrombelastographie, der dynamische Verlauf der gesamten Fibrinolyse nicht erfaßbar ist. Neben der genannten Thrombelastographie gehören hierher noch die Spontanaktivierungsmethoden mit verschiedener Erfassung des Restfibrins sowie die wohl genauesten Ergebnisse liefernde Euglobulinmethode.
2. Die Fibrinplattenmethode: Hier wirken die Fermente auf ein präformiertes Gerinnsel ein. Ein standardisiertes Vorgehen ist jedoch nur beschränkt möglich, da die aus dem gelösten Fibringerinnsel freiwerdende Flüssigkeit fortlaufende diskontinuierliche Verdünnungen der in dem eingebrachten Plasma vorhandenen Lysefermentkonzentration resultieren. Damit ist die Relation Ferment - Fibrinoberfläche dauernden Veränderungen unterworfen. Die abschließende Planimetrierung des Lysehofes hat große Fehlerquellen, zumal der Lysehof in vielen Fällen nicht kreisrund wird.
3. Messung der fibrinolytischen Aktivität an blutfremden Substraten. Hierbei werden die natürlichen Aktivatoren in ihren Beziehungen zum Fibrin - oder Plasmagerinnsel - außer acht gelassen (zB. Caseinsubstrat ect.). Die Versuchsanordungen sind technisch meist sehr aufwendig und kommen daher für klinisch - praktische Fragestellung kaum

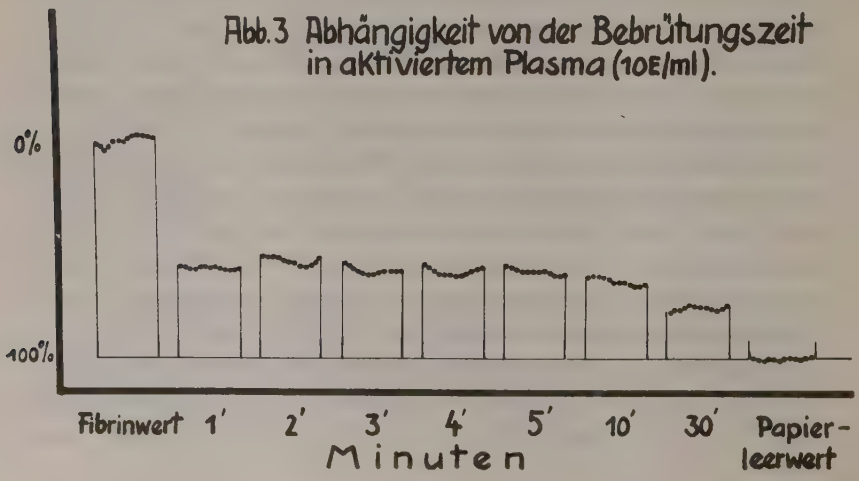
in Betracht. Für biochemische Belange, besonders der Bestimmung der Plasminaktivität, sind sie brauchbar. Zu erwähnen ist noch, daß alle genannten Methoden grundsätzlich sowohl mit nichtaktivierten wie aktivierten (zB.Streptokinase) Fibrinolysefermenten arbeiten.
Es schien somit berechtigt, eine neue Methode zu entwickeln, die einige der erwähnten Fehler vermeidet und im Gegensatz zu der im ersten Teil der Arbeit verwendeten Spontanfibrinolyse mit Ja-Nein-Aussage hier zu quantitativen Ergebnissen gelangt.

Prinzip:
Als Testsubstrat dient an normales Elektrophoresepapier adsorbiertes Rinderfibrin, das nach Inkubation mit einem Probandenplasma je nach der vorhandenen fibrinolytischen Aktivität verschieden stark herausgelöst wird. Durch Anfärben des Restfibrins und photometrische Auswertung des Papiers lassen sich quantitative Aussagen in Prozent machen.

Das Substrat wird in Form von o,3 %igem Rinderfibrinogen (in NaCl gelöst, Behring) durch Aufsaugen in normales Elektrophoresepapier gebracht. Nach gründlichem Abstreifen der überschüssigen Flüssigkeit - wir zogen die Papierstreifen mehrmals über ein weitlumiges Reagenzglas- wird das Papier horizontal aufgespannt, wodurch ein Absacken der Flüssigkeit der Schwerkraft nach vermieden wird (ein leeres Wasserbadgefäß hatte sich hier gut bewährt).
Nach einer kurzen Trocknungszeit von etwa 10 Minuten bei Zimmertemperatur sind die Papierstreifen noch feucht genug, um sich bei der nun folgenden Behandlung mit Thrombin (10 NIH E/ml, Behring) gut benetzen zu lassen. Die Streifen werden zur Umwandlung des Fibrinogens in Fibrin wie oben durch die Thrombinlösung gezogen und wieder zum Trocknen aufgehängt. Durch anschließendes zehnminütiges Erhitzen auf 80° C im Trockenschrank werden evtl. vorhandene Profibrinolysinspuren zerstört (Auerswald,Doleschl 11).
Bei Lagerung im Kühlschrank (5 - 10° C) verwendeten wir das Papier bis zu drei Tagen. Danach zeigt sich ein Abfall

der Testempfindlichkeit, ähnlich wie bei zu langem Erwärmen im Trockenschrank. Die später vorgenommene Aufbewahrung der Papier - Fibrin - Folien im Exsiccator ergab eine wesentlich längere Haltbarkeit. Die in einem Papierstreifen von ca 3o cm Länge enthaltene Fibrinmenge betrug durchschnittlich 8 mg.
Im Testansatz schnitten wir 3cm breite Papierstücke ab unter Verwerfung der Streifenenden, um durch den Aufhängemechanismus bedingte Inhomogenitäten in der Fibrinimprägnierung auszuschließen. Aus einem Streifen ergaben sich somit 5 - 6 Papierstücke.
Die zu untersuchenden Plasmen wurden mit physiologischer NaCl-Lösung verdünnt und mit Streptokinase aktiviert. Es wurde ein Mischungsverhältnis von 3,5 ml Plasma + 15,o ml NaCl + 3,5 ml Streptokinase, d.h. eine Plasmaverdünnung von 1 : 6,3 gewählt, wie bei der Marbetmethode.

In jedes Plasma wird sofort nach der Streptokinasezugabe, - wir verwendeten für Serienuntersuchungen eine Konzentration von 1o E/ml -, ein Papier getaucht und bei 2o° C (Zimmertemperatur) 15 Minuten"bebrütet". Bebrütungszeiten über drei Minuten bis 1o Minuten ergaben nur minimale Unterschiede, ebenso verschiedene Inkubationszeiten der Streptokinase bis 15 Minuten vor der Papierzugabe. Die Abb. 3 zeigt die Abhängigkeit von der Bebrütungszeit in aktiviertem Plasma.

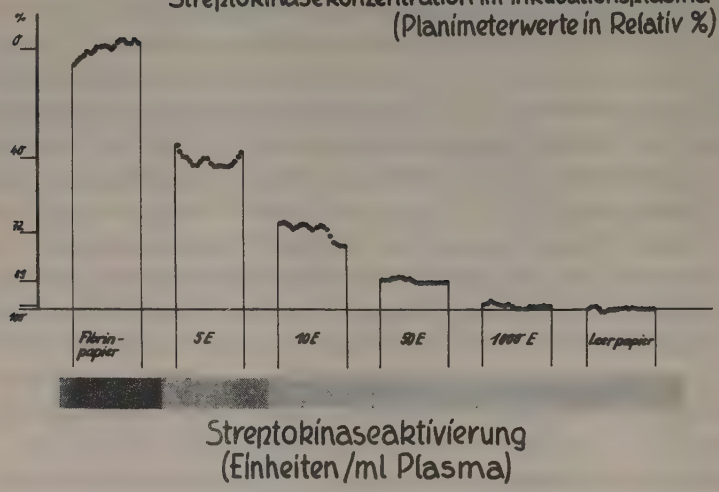


Mit "Fibrinwert" haben wir das Bezugspapier genannt, das nur in NaCl Lösung getaucht worden war, also keiner Lyse ausgesetzt war. Der Leerwert ist Elektrophoresepapier ohne Fibrinimprägnation und entspräche einer Totallyse, wie sie z. B. durch maximale Aktivierung erhalten werden kann.
Die Temperatur von 20° C benutzten wir wegen der geringen Stabilität des aktiven Fermentes bei Körpertemperatur und wegen der relativ geringen Aktivitätseinbuße bei niedrigeren Temperaturen. Wir haben den Temperatureinfluß bis zu 7° C getestet.
Nach dem Bebrüten kommen die Papiere in ein Wasserbad und werden hier ca. 30 Minuten in fließendem Wasser und anschließend über Nacht (21 Std.) in physiolog. NaCl-Lösung gewässert.
Dem Trocknen folgt ein Färben der Papiere mit Amidoschwarz wie bei der üblichen Elektrophoresefärbung (Äthanol - Eisessig 9 : 1 als Entfärber). Dem Färbeprozeß werden als spätere Bezugskontrollen noch die nicht lysierten Fibrinpapiere und ein Leerpapier beigegeben. Zur photometrischen Auswertung werden die Papiere mit Transparenzöl getränkt und zwischen zwei Glasplatten durch ein Elektrophoreseauswertegerät geschickt (Bender & Hobein).
An dem gekoppelten Zählwerk lassen sich die zugehörigen Planimeterwerte ablesen. Wir verwendeten jeweils nur zwei Zentimeter der erhaltenen Plateaus, da sich in den Randzonen verschiedene physikalische Phänomene auswirken (Blendenbreite usw.). Zur Berechnung werden die gefundenen Werte in Beziehung zum nicht- bzw. komplettlysierten Papier (= Leerpapier) gesetzt, nach der Formel:

$$100 - \frac{(\text{Lysepapier} - \text{Leerpapier}) \times 100}{(\text{Fibrinpapier} - \text{Leerpapier})} = \text{Lysequote in Prozent.}$$

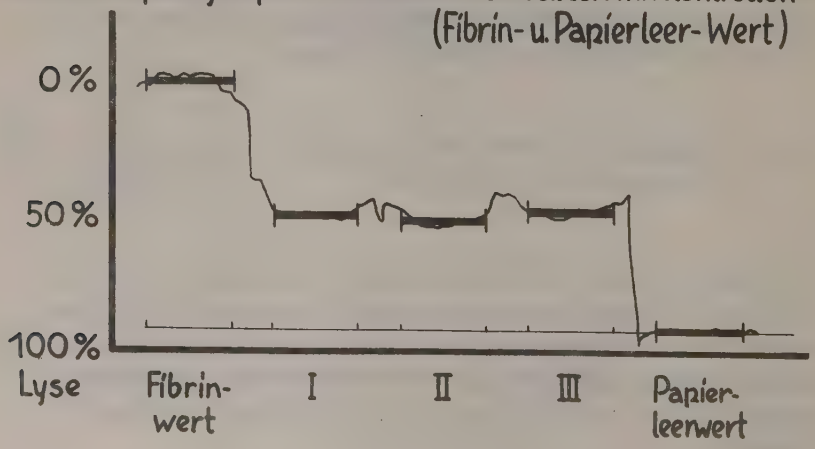
Die Abb. 4 zeigt die Abhängigkeit der Lysequote von der Streptokinasekonzentration; hieraus ist ersichtlich, daß eine Plasmaaktivierung mit 10 E/ml Streptokinase die besten Ablesewerte ergibt, da sie bei der etwa 50 %igen Lysequote Meßamplituden nach beiden Seiten hin offen läßt.

Abb. 4 Abhängigkeit der Papierfibrinolysequote von der Streptokinasekonzentration im Inkubationsplasma (Planimeterwerte in Relativ %)



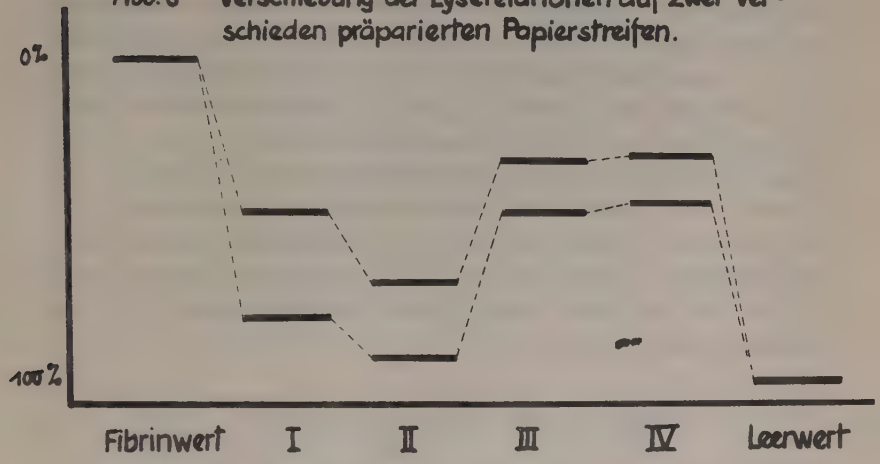
Bei Ansätzen aus ein und demselben Papierstreifen mit gleichem Plasma ergeben sich sehr gut übereinstimmende Werte, wie die Abb. 5 zeigt:

Abb. 5 Papierlysequote in 3 Parallelansätzen mit Kontrollen (Fibrin- u. Papierleer-Wert)



Größere Schwierigkeiten bereitet die Standardisierung der Papierstreifen untereinander, die nur durch absolut gleichen Herstellungsprozeß und gleiche Aufbewahrungsbedingungen vermindert werden können. Die Relationen verschiedener Plasmenwerte in Parallelansätzen bleiben jedoch auch auf unterschiedlichen Papierstreifen in etwa erhalten, wie das Kurvenbild der Abb. 6 zeigt:.

Abb. 6 Verschiebung der Lyserelationen auf zwei verschieden präparierten Papierstreifen.



Die jeweils untereinander verbundenen Plateaus entsprechen einem Papierstreifen, während die Zahlen römisch 1 - 4 vier verschiedene Plasmen sind, wobei die Relationen der Parallelansätze auf unterschiedlichen Papieren wahrscheinlich nicht in einem linearen Zusammenhang zueinander stehen. Bei Unterlassung der Thrombinbehandlung des mit Fibrinogen getränkten Papiers in sonst unveränderter Methode, sowohl mit wie ohne Hitzebehandlung, war keine Lyse zu erhalten. Eine Fibrinogenolyse konnten wir in dieser Anordnung also nicht nachweisen (15,86), was den Herstellungsprozeß der Testpapierstreifen wesentlich vereinfacht hätte.

Bei der Fehlerberechnung der Methode ergibt sich für das substratgetränkte Papier alleine eine 2-Sigmagrenzenablesegenauigkeit von $\pm$ 2,64 mm, d.h. bei dem üblichen Höhen-

unterschied zwischen Fibrin- und Leerwert von ca. 50 mm eine Streubreite von ± 5 %. Die Höhe des Fibrinwertes ist entsprechend den Eigenschaften des Amidoschwarzfarbstoffes in weitem Bereich direkt proportional zur eingelagerten Fibrinmenge. Bei der verwendeten Fibrinogenkonzentration von 0,3 g% ergab sich jene Plateauhöhe von durchschnittlich 50 mm.
Befindet sich an dem Elektrophoreseauswertegerät ein automatisches Planimetrierzählwerk, so ist man der "Interpolation" der erhaltenen Punkte enthoben und man braucht den erhaltenen Flächenwert nur durch die Plateaubreite (in unserem Fall jeweils 2 cm) zu dividieren, um die genaue Höhe des Lysenwertes zu erhalten.
Eine Streubreitenberechnung war wegen der jeweils nur 3 bzw. 5-fach möglichen Parallelansätze nicht gerechtfertigt. Wie jedoch die Abb. 5 zeigen kann, lagen die Parallelwerte innerhalb des oben berechneten Wertes von ± 5 %, der in erster Linie durch Inhomogenitäten bei der Imprägnierung bedingt ist.

Zusammenfassung:

Mit dieser neu entwickelten quantitativen Fibrinolysebestimmungsmethode erhielten wir bei einer, im Vergleich zu anderen Methoden sehr geringen Streubreite, folgende Ergebnisse:

1. Die Einwirkungsdauer von streptokinaseaktiviertem Plasma auf das "Fibrin - Papier" ergibt in dem Zeitbereich von 1 - 10 Minuten keine wesentlichen Unterschiede. Auch bei einer Zeitdauer von 30 min war nur eine geringe Steigerung zu erkennen.
2. Bei Aktivierung des Plasmas mit unterschiedlichen Streptokinasekonzentrationen ergab sich eine der Konzentration etwa logarithmisch proportionale Lysequote des Fibrins. Auch wir konnten mit dieser Methode eine maximale Aktivierung des Profibrinolysins ab etwa 300 E Streptokinase/ml Plasma feststellen (3).

3. Parallelversuche mit jeweils einem Plasma ergaben eine Streubreite der Lysequotenwerte von ca ± 5%.
4. Aus den drei Planimeterwerten von Leerpapier, lysiertem und nicht lysiertem Fibrinpapier ließen sich quantitative Aussagen über Streptokinasekonzentrationen und Plasmaunterschiede machen.

Das in steigendem Maße therapeutische Interesse der intravasalen Gerinnselauflösung fordert eine genügend empfindliche Kontrollmethode zur Therapieüberwachung. Wie die deutlichen Unterschiede bei geringen Aktivierungsunterschieden zeigten, scheint diese Methode auch für die klinische Anwendung empfindlich genug zu sein und wir hoffen, damit zur quantitativen Fibrinolysebestimmung erweiternd beitragen zu können.

L i t e r a t u r a n g a b e

1. Ablondi, F.B., DeRenzo E.C. Mechanism of Clot Lysis by Streptokinase and Effects of Epsilon-Aminocapronsäure. Proceedings of the Society for experimental Biology and Medicine. 1959, 102, 717 - 19.

2. Albrechtsen Ole K.: Fibrinolytic Activity in the Organism Acta physiologica Scandinavica, 1959, 47, Suppl, 165, 1 - 112.

3. Alkjaersig N, Fletcher, P.R., Sherry, Sol: The Activation of Human Plasminogen: I. Spontaneous Activation in Glycerol II. A kinetic Study of Activation with Trypsin, Urokinase. The Journal of biological Chemistry. 1958, 233, July 81 - 85 - 90.

4. Alkjaersig, N. Fletcher, P.R. Sherry, S. The Mechanism of Clot Dissolution by Plasmin. The Journal of Clinical Investigation. 1959, 38, VII, 1086 - 95.

5. Ambrus, C.M. ~~Claru~~, Back, N. Ambrus J.: Fibrinolytic Effect of Plasmin - Antiplasmin Complex. Federation Proceedings, 1960, 19, L, 58.

6. Anlyan W. G., Deaton H. L.: Experiences with Fibrinolysin in Peripheral Vascular Occlusive Disease. The Am. Journal of Cardiology August 1960, 6, 507 - 12.

7. Astrup T.: Activation of Fibrinolysis. Vox Sanguis. 1958, Vol 3, 1, 59 - 61.

8. Astrup T.: Neuere Aspekte in der Blutgerinnung und der Fibrinolyse und ihren Beziehungen zur Koronarthrombose und Koronarsklereose. Wiener Ztschr. für Innere Medizin und ihre Grenzgebiete. 1958, Sept., 39, 373 - 86.

9. Astrup T, Piper, J. Rasmussen J.: The Fibrinolytic System in Human Blood, as Exemplified in a Case of Macroglobulinemia. The Scand. Journal of Clinical and Laboratory Investigation. 1960, Vol 12, 336 - 41.

10. Astrup, Sterndorff: The Effects of Sodium Citrate and an Excess of Plasminogen on Fibrinolytic Agents. Thrombosis et Diathesis Haemorrhagica, 1960, Vol IV, No 3/4.

11. Auerswald, Doleschel: Critical Evaluation of the Fibrin Plate Method for Estimating Fibrinolytic Enzymes and Activators. Thromb. et Diathesis Haem. 1960, Vol V, No 1, 112 - 19.

12. Back, Ambrus, Sampson, Shulman: Study on the Effect of Streptokinase-activated Plasmin (Fibrinolysin) on Clots in Various Stages of Organisation. Journal of Clinical Investigation 1958, VI, 37, 864 - 71.

13. Bayerle, Kammhuber: Über Fermenteffektoren der Fibrinolyse: II. Mitteilung: Die Bedeutung der Erythrozyten für die Fibrinolyse. Blut, April 58, 11, 78 - 85.

14. Beller F.K.: Untersuchungen über die Inaktivierung von Streptokinaseativiertem Plasma (Dissert.) Blut, 1958, 4, (6 - 7), 367 - 72.

15. Beller, Glas: F.K. P. Inhibition of Clotting as the Result of Plasminogen Activation by Streptokinase. II. Analytic Studies of the Clotting Mechanism. Thromb. et Diathesis Haem. 1960, IV, No 3/4, 520 - 33.

16. Beller, Nagel: F.K. W. Thrombolyse: Eine neue Therapie thromboembolischer Erkrankungen. Die Medizinische Welt 1960, Sept., 36 - 37.

17. Bierstedt: P. Über die Beteiligung der Thrombozyten an der Fibrinolyse. Zeitschrift für die gesamte experimentelle Medizin, 1957, 129, 164 - 70.

18. Bierstedt: P. Die Beziehung des fermentativen Fibrinabbaus zur Fibrinreifung. Hoppe- Seyler's Ztschr. für physiolog. Chemie, 1956, 305, 158 - 164.

19. Bierstedt: P. Körpergewebe als Quelle fibrinolytischer Aktivität des Blutes und anderer Flüssigkeiten. Thrombose und Embolie. I. Internationale Tagung in Basel. 1954.

20. Billimora, Drysdale, James, Maclagan:
Determination of Fibrinolytic Activity of Whole Blood (with special Reference to the Effects of Exercise and Fat Feeting).
Lancet 1959, II, 471.

21. Buckell M.:
The Effect of Citrate on Englobulin Methods of Estimating Fibrinolytic Activity.
Journal of clinical Path. London.
1958, 11, 403 - 05.

22. Buckell, M. Elliot: F.R.
Effect of Butter Lipämia on the Rate of Clote Lysis in Normal Males.
Lancet 1959, I, 662 - 63.

23. Buckell, M. Elliot: F.R.
Diurnal Fluctuation of Plasma-Fibrinolytic Activity in Normal Males.
Lancet 1959, I, 660 - 62.

24. Buckell, M. Truscott: M.
Salt Concentration and Fibrinolytic Activity.
Nature 1959, 183, 1068 - 69.

25. Camerada, P. Congiu, M. Leo, P.:
Modificazioni del Potere fibrinolytico del plasma in Soggetti Aterosclerotici con e Senza complicationi Trombotiche in atto o Pregresse.
Rassegna Medica Sarda
1961, Nov., Dez., 59. 827 - 37

26. Cliffton: E.E.
Physiological Mechanisms of Fibrinolysis.
Acta Haematologica 1958,
Vol 20, 76 - 85.

27. Czarnecki: W.
Fibrinolytic Activity of Blood in Intermittent Claudication (Mitteilung).
Lancet, 1, 1960, 289.

28. Davies, M.C. Englert: M.E.
Physical Properties of Highly Purified Human Plasminogen.
The Journal of Biological Chemestry
1960, 4, 235, 1011 - 13.

29. Davies, N.D. Carroll, B.J. Schwartz, S.H.:
Treatment of Thrombophlebitis with a Fibrinolytic Agent.
With Special References to Side Effects.
Am. Journal of Cardiology
1960, 6, 513 - 18.

30. Deutsch: E.
Blutgerinnungsfaktoren, I. Einzeldarstellung aus der Biochemie.
Franz Deuticke,
Wien 1955.

31. Deutsch, E. Abe, T.: Einfluß von Jonenaustauschern auf die durch Streptokinase induzierbare fibrinolytische Aktivität. Wiener Ztschr. für innere Medizin, 1959, 40, Heft 2, 52 - 59.

32. Deutsch, E. Elsner, P.: Fibrinolysis and Lipid Metabolism. Nutrition Reviews 1959 Bd. 17, Sept, 263 - 65.

33. Deutsch, E. Elsner, P.: Pyrogens as Thrombolytic Agents. Clinical and Experimental Studies. Am. Journal of Cardiology 1960, 6, 420 - 25.

34. Deutsch, E. Fischer, M.: Die Wirkung intravenös applizierter Streptokinase auf Fibrinolyse und Blutgerinnung. Thrombosis et Diathesis Haem. 1960, IV, 3/4, 482 - 506.

35. Duguid, J.B. Aberd, M.D.: Diet and Coronary Disease. Lancet, 1954, May 1, 891 - 95.

36. Fearnley, G.R. Ferguson, J.: Effect of Beer on Blood Fibrinolytic Activity. The Lancet, 1960, L, 184 - 86.

37. Fearnley, G.R. Lackner, R.: The Fibrinolytic Activity of Normal Blood. British Journal of Hämatology 1955, L, 189 - 98.

38. Fearnley, G.R. Vincent, C.T. Chakrabarti, R.: Reduction of Blood Fibrinolytic Activity in Diabetes Mellitus by Insulin. Lancet 1959, II, 1067.

39. Fonio, A.: Über die Fibrinolytischen Vorgänge in Vitro und in Vivo. Ergebnisse der Chirurgie und Orthopädie, 1959, Okt., No. 42, 203 - 41.

40. Freimann, A.H. Cliffton, E.E.: The Effect of Fibrinogen Concentration on the Susceptibility of Clots in vitro Lysis with Plasmin. Thromb. et Diathesis Haemorrhagica 1958, II, 3/4, 269 - 78.

41. Gillman, Naidoo, Hathorn: Plasma Fibrinogen Activity in Pregnancy. Lancet 1959, II, 70.

42. Glas, P. Beller, F.K.: Inhibitation of Clotting as the Result of Plasminogen Activation by Streptokinase. I. Studies of the Inactivation of Fibrinogen. Thromb. et Diathesis Haemorrhagica 1960, IV, 507 - 19.

43. Greigh, Runde: Studies on the Inhibition of Fibrinolysis by Lipids.
Lancet 1957, II, 461 - 64.

44. Greigh: Inhibition of Fibrinolysis by Alimentary Lipämia.
Lancet 1956, II, 16 - 18.

45. Halse: Das fibrinolytische Potential, Medizini- (Enzymologie, Pathalogie und Klinik) sche
Friedrich - Karl - Schattauer - Vlg.
Stuttgart 1,
1958, Dez., 50/51.

46. Hörder, Kickhöfen; Wendt: Aktivierung der Fibrinolyse beim Menschen durch ein bakterielles Pyrogen. (Der Einfluß von Phenylbutazon und Heparin auf Fibrinolyse, Blutgerinnung und Fieberreaktion.)
Klinische Wochenschrift, 1958,
36, Heft 4, 164 - 66.

47. Hougie, Ayers: Lipaemia and Fibrinolytic Potentiality.
The Lancet 1960, 186 - 88.

48. Jürgens J.: Die klinische Bedeutung fibrinolytischer Vorgänge.
Deutsche Medizinische Wochenschrift
1959, 84. Jahrgg. 2285 - 89.

49. Katshuhiro, Keiji, Toyome: Analysis of Fibrinolysis by the Use of Epsilonaminocaproic Acid: Preliminary Report.
Blood, 1960, 15, 690 - 97.

50. v. Kaulla: Die Rolle des Aktivatos beim Abbau menschlicher Fibringerinnsel (erste Ergebnisse mit einer neuen Einheitstechnik).
Klinische Wochenschrift, 38. Jahrgg.
6, 1960, 288 - 90.

51. v. Kaulla, McDonald: The Effect of Heparin on Components of the Human Fibrinolytic System.
Blood, No. 8, 1958, 811 - 21.

52. Koller F.: The Development of our Knowledge of Fibrinolysis.
Am. Journal of Cardiology
1960, 6, 367 - 70.

53. Kommerell: Arteriosklerose und Blutgerinnung.
Der Internist, 1961, Heft 3, 134 - 39.

54. Kommerell, Berger: Untersuchungen zur Gerinnungsaktivität und Fibrinolyse bei alimentärer Lipämie.
Klinische Wochenschr. 1959, 19, 1029-33.

55. Kowalski, Latallo, Niewarowski, Zbigniew: Untersuchungen über die Aktivierung des Plasminogens und die Inaktivierung des Plasmins. Folia Haematologica, 1957, 75, 225 - 41.

56. Lackner, Goossen: Fibrinolytic Activity of Blood: Photographic Determination of Clot Lysis Time. Acta Haematologica, 1959, 22, 58 - 64.

57. Lackner, Merskey: Fibrinolysis after acute myocardial Infarction and after the Administration of oral Anticoagulant Drugs and intravenous Heparin. South african Medical Journal 1959, 7. Nov., 33.

58. Ladehoff: The Content of Plaminogen Activator in the Human Urinary Tract. The Scandinav. Journal of Clinical & Laboratory Invest. 1960, 12, 136 - 39.

59. Lewis, Ferguson: Journal clinical Investigation. 1950, 29, 1059.

60. MacFarlane, Biggs: Observations on Fibrinolysis, Spontaneous Activity associated with Surgical Operations, Trauma & c. The Lancet, 1946, 14. Dez., 862 - 63.

61. MacFarlane, Biggs: Fibrinolysis. Its Mechanism and Significance. Blood, 1948, III, 1167 - 87.

62. Marbet R.: Fibrinolyse. Wissenschaftliche Ausstellung auf der 31. Tagung der Deutschen Gesellschaft für Gynäkologie in Heidelberg 1956 Aus den wissenschaftlichen Laboratorien der I. Hoffmann - La Roche & Co. AG.

63. Markus, Ambrus: On the Formation of Different Types of Plasmin by Streptokinase Activation. The Journal of Biological Chemestry 1960, No 6, Vor 235, 1673 - 79.

64. Meneghini: Fibrinolytic Treatment of Thrombo-Embolic Diseases with Purified Bacterial Pyrogens. Acta Haematologica, 1958, Vorl. 19. 65 - 81.

65. Mitchell, Sheila: Effects of Cholesterol, Cholesterolester and Neutral Fats on Fibrinolysis Lancet 1959, II, 435.

66. O'Neal, R. Roosevelt T., Tittman, Wilburg Th.: Butter, Corn Oil and Fibrinolysis in Rats.
Official Journal of Am. H.Ass.
1959, Nov., 989.

67. Nestel: P.J. Fibrinolytic Activity of the Blood in Intermittent Claudication.
Lancet 1959, II, 373.

77. Nicola, P. Mazzetti: G.M. Analysis of the Streptokinase Activated fibrinolysis by means of Thrombelastography.
Blut, 1957, III, 20 - 26.

69. Nitzberg, S. Peyman, H. Goldstein, Z. Proger: S.
Studies of Blood Coagulation and Fibrinolysis in Patients with Idiopathic Hyperlipämia and Primary Hypercholesteremia before and after a Fatty Meal.
Circulation, Official Journal of the Am. H!Ass.
1959, 19, 676 - 690.

70. Norman Ph.S: Some Aspects of the Chemistry of Plasmin and its Inhibitors.
Am. Journal of Cardiology
1960, Aug., 6, 390 - 98.

71. Norman Ph.S: Studies of the Plasmin System: II. Inhibition of Plasmin by Serum or Plasma.
The Journal of Experimental Medicine,
1958, 108, 53 - 68.

72. Norman Ph.S; Hill B.M.: Studies of the Plasmin System:
III. Physical Properties of the 2 Plasmin Inhibitors in Plasma.
Journal of experim. Medicine,
1958, 108, 639 - 49.

73. Permin: M. Properties of the Fibrinokinase-Fibrinolysin System.
Nature, 1947, Okt., 571 - 72.

74. Philips, L.L. Skrodelis: V. The Fibrinolytic Encyme System in Normal, Haemorrhagic and Disease States.
Journal of Clinical Invest. 1958
VII, 965 - 73.

75. Ratnoff, O.D. Donaldson: V.H. Physiologie and Pathologie Effects of Increased Fibrinolytic Activity in Man. With notes on the Effects of Exercise and Certain Inhibitions on Fibrinolysis.
Am. Journal of 1960 Cardiology
August, 6, 378 - 86.

76. Rybak: M. The Use of Mg^{++} for the Isolation and Purification of Human Plasmin.
Clinica Chimica Acta, 1959, 4, 311 - 12.

77. Rybak, M. Rejnek: J.
The Antiplasmin Effect of Plasma Fractions.
Clinica Chimica Acta, 1959, 4, 364 - 68.

78. Sandberg, H~~erscher~~, Tsitouris, G. Bellet:
Expereinces with Inhibitors to the Plasmin - Plasminogen System in the Human Subject.
(Their Modifications by Thrombolysin Therapy).
Am. Journal of Cardiology
1960, 6, 432 - 38.

79. Sawyer, W. Fletscher, R. Alkjaersig, N. Sherry, S.:
Studies on the Thrombolytic Activity of Human Plasma.
Journal Clinic. Invest.
1960, 22. Okt. 59.

80. Scott, R.F. Wilburg, T.H.:
Methods of Comparing Effects of Various Fats on Fibrinolysis. Proceedings of the Soc. f. exp. Biology and Medicine,
1957, Okt./Dec., Vol 96, 24 - 29.

81. Seegers: W.H.
Thrombin - E as a Fibrinolytic Encyme.
Science, 1960, 131, 726.

82. Sherry, S. Alkjaersig, N.:
Studies on the Fibrinolytic Encyme of Human Plasma.
Thromb. et Diath. H.
1957, Vol I, No 2, 264 - 88.

83. Sherry, S. Fletscher, R. Alkjaersig, N.:
Fibrinolysis and Fibrinolytic Activity in Man. Physiological Rev.
1959, Vol 39, 343 - 82.

84. Shulman, S. Alkjaersig, N. Sherry, S.:
Physiochemical Studies on Human Plasminogen (Profibrinolysin) and Plasma (Fibrinolysin).
The Journal of Biological Chemestry
1958, July, 91 - 97.

85. Sjoerdsma, R. Nilsson, I.M.:
Aliphatic Amino Compounds as Inhibitors of Plasminogen Activation.
Proceedings of the Soc. for Experimental Biology and Med.
1960, 103, 533 - 35.

86. Stefanini M~~arie~~:
Fibrinolysis as Mechanism of Haemorrhagie Tendency.
Acta Haematolegica, 1958, Vol 20, 85 - 96.

87. Todd: R.S.
Fibrinolysis Autographs.
Nature, 1959, 184/2, 495 - 96.

88. Villavicencio, I.L. Warren, R.: Clinical Determination of Fibrinolytic Activity (an Evaluation of some Methods). A.M.A. Archives of Surgery.
1959, ~~184/2~~, 1937 - 38.
Vol. 78, 639 - 46.

89. Weiner: M. Lability of Fibrinolysin.
Nature, 1959, 184/2, 1937 - 38.

90. Weiner, M. Crinis, K. Redish, W. Steele, M.:
Influence of some Vasotonic Drugs on Fibrinolytic Activity.
Circulation, Off. Journal of the Am. H.Ass.
1959, Vol 19, 845 - 48.

Nachtrag:

91. Goossens N,Walcher A: Changes of Blood Coagulation-Factors in obstructive Arteriopathies.
Proc. of the VIII th Internat.Congr. of Haematology, Tokyo 1960 (i.Druck)

92. Goossens N,Walcher A, Heparin - Protamintitration,Heparintoleranz und Gerinnungsfaktoren bei obliterierendem Arteriopathie.
67.Tagg.der dt.G.f.interne Medizin.
Wiesbaden 1961 (im Druck)

93. Walcher A, Goossens N, Hess, Stumpf: Heparintoleranz und Gerinnungsfaktoren bei obliterierender Arteriopathie. Klinische Wochenschrift 38, 952 (1960)

94. Walcher, A. und N.Goossens: Fibrinolyse - Untersuchungen bei Patienten mit obliterierender Arteriopathie VIII. Kongreß der Europäischen Gesellschaft für Hämatologie, Wien 1961 (im Druck)

Lebenslauf:

Ich, Rainer Erwin Wolfgang M ü l l e r , wurde am 16. August 1936 als Sohn des Volksschullehrers Dr. phil. Erwin Müller und seiner Ehefrau, Dr. med. Tilla Müller - Herforth, in Marktredwitz geboren. Hier besuchte ich die Volks- und Oberrealschule, an der ich im Juli 1956 meine Reifeprüfung ablegte.
Mein Medizinstudium begann ich mit den ersten fünf Semestern an der Universität in Erlangen, wo ich auch die ärztliche Vorprüfung im Februar 1959 bestand. Nach einem Semester in Kiel kam ich nach München und habe hier das medizinische Studium mit dem Staatsexamen im Juli 1962 abgeschlossen.